

Efecto del tiempo sobre la estabilidad de variables hematológicas en muestras de sangre de caninos

Effect of time on the stability of hematological variables in dog blood samples

Ana Meneses Guevara¹, Laura Bouza-Mora¹, Juan José Romero-Zúñiga²

¹ Laboratorio de Análisis Clínicos, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. E mail: anag.meneses@gmail.com / E mail: lalybo@gmail.com

² Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. E mail: juan.romero.zuniga@una.cr

Recibido: 06 Diciembre 2011. *Corregido:* 16 Abril 2013. *Aceptado:* 08 Mayo 2013.

Resumen. En este estudio se valora el efecto del tiempo en la conservación de muestras de sangre de perros. Las variables hematológicas estudiadas fueron: hematocrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), cómputo de leucocitos y el diferencial leucocitario. Se sangraron, al azar, 40 caninos de distinta raza, edad, sexo y condición clínica, atendidos en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV) de la Universidad Nacional, durante el período: agosto del 2007 a mayo del 2008. La sangre se tomó de la vena cefálica, mediante el sistema al vacío; (Vacutainer®), se utiliza como anticoagulante la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la EMV para la realización de los análisis, conservándolas a una temperatura de 4°C. Las metodologías empleadas comprendieron métodos manuales convencionales. Cada muestra fue analizada cuatro veces; el primer análisis se realizó durante la primera hora después de la toma y, sucesivamente, a las 24, 48 y 72 horas. El análisis estadístico (SAS ver.9.2) comprendió el cálculo de estadísticos descriptivos de cada variable hematológica; además, se llevó a cabo una comparación de *medias* de cada una de las variables en el tiempo, según el agrupamiento de los valores por terciles, para valorar el posible efecto de la concentración y la celularidad. Los resultados mostraron diferencias mínimas no significativas a través del tiempo, por lo cual, las implicaciones clínicas o biológicas y, por ende la posibilidad de establecer un diagnóstico clínico errado son improbables, dada la estabilidad de las variables hematológicas analizadas.

Palabras claves. sangre total, conservación, hemograma, tiempo, caninos.

 Autor para correspondencia



Abstract. The aim of this study was to assess the effect of the time of storage of dog blood samples. Hematological variables studied included: Hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocyte and differential leukocyte counts. Samples were collected from 40 dogs of different breed, age, sex, and clinical condition treated at the Hospital for Small and Wild Species of the School of Veterinary Medicine (EMV) from Universidad Nacional in Costa Rica, during the period from August 2007 to May 2008. Blood samples were taken from the cephalic vein, using the vacuum system (Vacutainer®) with disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. Samples were analyzed in the Laboratory of Clinical Analysis at the EMV and were kept at a temperature of 39.2°F (4°C). Methodologies used included conventional manual methods. Each sample was analyzed four times; the first analysis was done during the first hour after sampling, and successively at 24, 48 and 72 hours. Statistical analysis (SAS ver.9.2) included the calculation of descriptive statistics for each hematological variable, a comparison of means for each of the variables in the time, according to the data grouped in terciles in order to assess the possible effect of concentration and cellularity. Results showed minimal not significant differences over time; therefore, clinical or biological implications, and thus the possibility of establishing a wrong clinical diagnosis, is unlikely, given the stability of the hematological variables analyzed.

Keywords. whole blood, preservation, hemogram, time, canines.

INTRODUCCIÓN

Los análisis sanguíneos son una herramienta complementaria, de gran valor, en el diagnóstico clínico del paciente, especialmente en especies de compañía, como el perro. La confiabilidad de los resultados depende, entre otros factores, de la preservación de la integridad de la sangre. La estabilidad de los elementos de la sangre requiere de condiciones controladas en el manejo que incluyen desde la toma de la muestra hasta la realización de los análisis (Rosato, et al., 2009).

La evaluación del sistema hematopoyético es fundamental para conocer el estado de salud de un individuo. Entre las diversas pruebas hematológicas con que se cuenta hoy día, el hemograma es el examen recomendado, prioritario por la amplia y valiosa información que brinda al médico tratante. Así, entre otros, permite detectar la anemia y el tipo de anemia; estados de inflamación aguda por la presencia de segmentados en banda o procesos crónicos por hallazgo de monocitos; estados virales que cursan con linfocitosis; presencia de eritroblastos que indican regeneración medular acompañados de basofilia difusa; procesos mieloproliferativos por conteos celulares altos o células atípicas. La toma y conservación de la sangre total es indispensable para obtener datos confiables. Entre los factores más críticos por controlar, se incluye el tipo y concentración del anticoagulante, la temperatura y el tiempo de almacenaje. El anticoagulante recomendado, para la

realización del hemograma, es la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la concentración de 1mg/1ml de sangre; concentraciones mayores provocan disminución en el hematocrito y el volumen corpuscular medio (VCM), aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), mientras que la concentración de hemoglobina y los conteos celulares no se alteran (Doyle, 1967; Hinton & Jones, 1978; Penny et al., 1979; Cohle, 1981). La temperatura adecuada de conservación de las muestras de sangre, para reducir la glicólisis, es de 4°C (Meyer & Harvey, 1998; Hendrix, 2002; Thrall, 2004; Weis & Wardrop, 2010). El mantenimiento a temperatura ambiente, entre 20 a 25°C, ocasiona una dilatación de los eritrocitos, la cual se refleja en un incremento del hematocrito y del volumen corpuscular medio (VCM); así como una disminución de la concentración de hemoglobina y una reducción en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Thrall, 2004; Willard & Tvedten, 2004; Freise et al., 2009). El mantenimiento de las muestras a 4°C hoy es factible, pues se dispone de termos, gelatinas refrigerantes, hielo, refrigeradoras portátiles y de laboratorio, entre otros elementos; sin embargo, el tiempo, desde la toma hasta la realización de los análisis, es más difícil de controlar dado que, no siempre, el laboratorio se encuentra a una distancia razonable, o la muestra no se puede analizar inmediatamente por horarios de trabajo o motivos diversos, como días feriados.

En la Medicina Veterinaria, el hemograma se ha constituido en un examen rutinario, a tal punto que muchas decisiones clínicas se toman con base en los resultados. Por tanto, los datos generados por los laboratorios deben ser precisos y exactos. La confiabilidad de los resultados exige una rigurosidad tanto en la fase preanalítica (preparación del paciente y recolección de la muestra) como en la fase analítica (montaje de las técnicas). Datos erróneos no solamente retardan un diagnóstico sino que pueden atentar contra la vida del paciente; por ello, es indispensable la preservación adecuada de la sangre total. La información concerniente al tiempo de preservación, respecto a la viabilidad de la muestra de sangre, es escasa y variada; así, por ejemplo, Meyer & Harvey (1998) apuntan que después de 12 horas pos-toma y a 4°C puede haber cambios en el hematocrito, hemoglobina, cómputo de eritrocitos y los índices hemáticos; asimismo, Medaille et al., (2006) demostraron que las variables hematológicas sufren cambios significativos entre las 24-48 horas de conservación, pero clínicamente no conllevan a errores. Por el contrario, Schalm et al., (1986), no reportan cambios en el hematocrito, hemoglobina y cómputo de células en muestras conservadas a 4°C por 24 horas. Sáenz et al., (2003), por su parte, recomiendan que el tiempo ideal para realizar cómputos celulares y hematocritos no debe exceder las 12 horas post toma de la muestra. Sin embargo, Willard & Tvedten (2004) señalan que no hay claridad sobre el comportamiento de variables hemáticas después de conservar la sangre 24 horas a 4 °C.

Al considerar la diversidad de criterios, en cuanto al manejo y conservación de las muestras de sangre total, con énfasis en la realización del hemograma y ante la escasa información respecto al comportamiento de las variables hematológicas en muestras preservadas, este trabajo tuvo como objetivo valorar el efecto del tiempo (72 horas) sobre las variables del hemograma bajo condiciones de manejo controladas (anticoagulante y temperatura) y bajo condiciones propias del laboratorio de la EMV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma y manejo de las muestras sanguíneas

Se sangró a 40 caninos, de diferentes razas, sexos y condiciones clínicas, atendidos en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional durante el período de agosto del 2007 a mayo del 2008. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena cefálica, utilizando el sistema al vacío (Vacutainer®) y el EDTA (concentración 1mg/dl) como anticoagulante. Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la EMV, para su procesamiento y análisis. La cantidad de sangre extraída fue de 5ml, de acuerdo con la concentración del anticoagulante. El tiempo transcurrido, entre la extracción de la sangre y el arribo al laboratorio, no sobrepasó los 45 minutos. Durante este lapso, las muestras permanecieron en posición vertical y en reposo absoluto. En el laboratorio, las muestras fueron colocadas en una refrigeradora a una temperatura constante de 4°C.

Análisis hematológicos

Las variables hematológicas analizadas se realizaron por medio de metodologías manuales convencionales, que consisten en: 1) hematocrito, utilizando el método de microhematocrito por medio de una centrífuga de alta velocidad (IAC), durante 5 minutos a 13.000 rpm; 2) hemoglobina, por el método colorimétrico de cianometahemoglobina, utilizando el espectrofotómetro Coleman Junior II. Modelo 6/20; 3) concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), obtenida de la relación matemática hemoglobina/hematocrito; 4) cómputo total de leucocitos, por método manual, utilizando el hemocitómetro de Neubauer, se contaron las 4 esquinas y el número total se obtuvo multiplicando por el factor 50, y 5) el diferencial leucocitario, realizado en un frotis sanguíneo, secado al aire y posteriormente sometido a la tinción de Giemsa-May Grünwald (Schalm et al., 1978, Meneses et al, 1993, Malcom et al., 1998). Los análisis fueron realizados bajo un programa de seguridad analítica aplicado en el laboratorio (Hendrix, 2002).

A cada muestra se le realizó el hemograma cuatro veces, realizando el primer análisis durante de la primera hora, posterior al arribo al laboratorio, y repitiendo luego a las 24, 48 y 72 horas.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para cada una de las variables hematológicas y para el diferencial leucocitario; asimismo, se compararon los promedios de cada una de esas variables en el tiempo por medio de los intervalos de confianza al 95%, calculados mediante el paquete estadístico SAS ver.9.2. Adicionalmente, para valorar el posible efecto de la concentración o el nivel de celularidad de la muestra, se realizó un agrupamiento de los valores obtenidos según los terciles, obteniendo así tres grupos (nivel bajo: primer tercil, nivel medio: segundo tercil, nivel alto: tercer tercil) dentro de los cuales se realizó la misma estadística descrita para la variable en forma general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables hematológicas mostraron alta estabilidad durante el tiempo, sin diferencias significativas, aún a las 72 horas después de su extracción; así, el hematocrito mostró una variación máxima absoluta de $\pm 1\%$ en el promedio a distintos tiempos, con un mínimo de 35,5% (24 h) y un máximo de 36,5% (72 h). De la misma forma la hemoglobina, cuyos valores estuvieron entre 11,0 y 11,3 g/dl, mientras que la CHCM no varió en más de 0,7 g/dl (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comportamiento del hematocrito, hemoglobina y CHCM a través del tiempo.

Parámetro	1 hora (IC 95%)	24 horas (IC 95%)	48 horas (IC 95%)	72 horas (IC 95%)
Hematocrito (%)	35,6 (33,4 - 33,7)	35,5 (33,3 - 37,6)	36,4 (34,2 - 38,5)	36,5 (33,9 - 39,0)
Hemoglobina (g/dl)	11,1 (10,3 - 11,9)	11,0 (10,2 - 11,8)	11,0 (10,2 - 11,8)	11,3 (10,4 - 12,2)
CHCM (g/dl)	30,9 (30,2 - 31,7)	30,2 (29,8 - 31,6)	30,7 (29,4 - 31,1)	30,7 (30,1 - 31,4)

Los conteos leucocitarios, tanto el total como el diferencial, tampoco presentaron cambios significativos a través del tiempo de estudio. Por ejemplo, el total de leucocitos inició con un promedio de 13952/ul dentro de la primera hora de toma de la muestra, y finalizó en 13688/ul a las 72 horas. Similar comportamiento tuvieron las bandas, los segmentados, los eosinófilos, los basófilos, los monocitos y los linfocitos (Cuadro 2).

Al analizar los valores obtenidos dentro de los tres grupos de muestras agrupados según los terciles, no hubo cambios significativos ni importantes en las variables hematológicas entre los resultados obtenidos en la primera hora, hasta las 72 horas.

La influencia del tiempo sobre la conservación de la sangre, obtenida en este trabajo, concuerda con los de Hirase et al., (1992); Freise et al., (2009) y Aecio de Oliviera et al., (2010), quienes documentan la ausencia de cambios importantes en las variables hemáticas a través del tiempo. En el estudio, las variaciones fueron mínimas y sin significancia estadística. Es altamente probable que los pequeños cambios se asocien principalmente a factores técnicos e intrínsecos de los métodos analíticos y no a cambios sustanciales en la composición de la sangre total.

Cuadro 2. Comportamiento de los leucocitos a través del tiempo

Célula	1 hora	24 Horas	48 Horas	72 Horas
	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
Leucocitos (ul)	13952 (11716 - 16188)	15556 (11531 - 19581)	13262 (11220 - 15309)	13688 (11412 - 15966)
Bandas (ul)	270 (145 - 423)	222 (60 - 456)	203 (89 - 341)	148 (48 - 276)
Segmentados (ul)	9655 (7551 - 11971)	10671 (7268 - 14523)	9314 (7254 - 11604)	9332 (7040 - 11920)
Eosinófilos (ul)	726 (430 - 1089)	829 (369 - 1459)	670 (305 - 1130)	702 (244 - 1295)
Basófilos (ul)	25 (-4 - 62)	36 (-21 - 123)	20 (-21 - 75)	25 (-21 - 85)
Linfocitos (ul)	3206 (2189 - 4414)	3663 (2110 - 5639)	3037 (2004 - 4277)	3173 (2038 - 4549)
Monocitos (ul)	91 (48 - 144)	98 (30 - 194)	99 (36 - 181)	93 (27 - 177)

Si bien es cierto, las condiciones de almacenamiento y manejo de las muestras sanguíneas no alteraron, en forma significativa, los resultados de las variables, se debe ser claros que los resultados de este estudio se basan en un protocolo de manejo de la muestra que incluye el uso de EDTA como anticoagulante. En la concentración y cantidad de sangre que especifica el fabricante del tubo -para evitar excesivas cantidades de anticoagulante por ml de sangre-, las muestras se mantuvieron siempre a 4°C, en reposo y en posición vertical; realmente, las muestras se trabajaron en condiciones intra-hospitalarias. Es necesario recalcar que el estudio no permite asegurar que los eritrocitos y leucocitos no sufrirán cambios en otras condiciones, como las encontradas en el campo, que, aunque las muestras sean transportadas en refrigeración con hielo o geles refrigerantes, son sometidas probablemente a cambios de temperatura y constante agitación durante su transporte.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio demuestran que las condiciones preanalíticas y analíticas aplicadas brindan una exactitud y precisión a los exámenes hematológicos óptima en un tiempo de 72 horas. Las variaciones en las concentraciones y cantidades numéricas de los componentes sanguíneos fueron de baja magnitud y no conllevan a implicaciones clínicas o

biológicas; por ello, la posibilidad de caer en un diagnóstico clínico errado es poco probable, dada la estabilidad de las variables del hemograma. El protocolo establecido posee alta confiabilidad y se recomienda para la realización del hemograma. La evaluación se realizó en 72 horas, al considerar que es el tiempo óptimo en situaciones como un fin de semana o días feriados, cuando se retarda el procesamiento de las muestras. Los resultados obtenidos no deben incentivar a médicos tratantes ni a los responsables de los laboratorios de análisis clínicos, a enviar o procesar muestras de sangre con varios días de obtenidas; en especial si junto al hemograma se requiere la detección de hemoparásitos. Lo recomendable es realizar el hemograma lo más pronto posible; en parte por la orientación clínica que aporta.

Asimismo, es necesario recordar que las condiciones valoradas son variables independientes de la metodología empleada, sea esta de forma manual, semiautomática o automática. Los procedimientos automáticos cuentan, entre otras ventajas, de una mayor precisión, rapidez y menor costo; sin embargo, condiciones inapropiadas, en la toma y manejo de las muestras, conllevan a errores analíticos similares, sea cual sea la metodología empleada.

AGRADECIMIENTOS

Al señor Olman Mesén por el apoyo técnico y a los estudiantes de los cursos de Internado Rotatorio de la carrera de Medicina Veterinaria que colaboraron con el estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aécio de Oliveira C. J., D. Ribeiro Filho, J. D. Guimarães, A. R. Silva, W. de Ferreira Dantas, L. de Paula Bonfál, and S. Kreutzfeld de Farias. 2010. Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. *Cienc. Rural* 40: 2221-2226.
- Cohle, S., D. A. Saleem, and D. E. Makkaoui. 1981. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. *Am. J. Clin. Pathol.* 76:67-69.
- Doyle, C. T. 1967. The effect of blood volume and choice of anticoagulant on the PVC, MCHC and total white cell count. *Irish journal of medical science*. [en línea] 42: 429-435. Consultado 21 de Julio 2011. <http://www.springerlink.com/content/c3m1230l68v19127/>.
- Freise, K. F., R. Schmidt, L. Gingerich, P. Veng-pedersen and, A. Widness. 2009. The effect of anticoagulant, storage temperature and dilution on cord blood hematology parameters over time. *Int. J. Lab. Hematol.* 31: 496-504.
- Hendrix, Ch. M. 2002. *Laboratory procedures for veterinary technicians*. 3rd. ed. Mosby, Missouri, U.S.
- Hinton M., and D. R. E. Jones. 1978. The haematological examination of canine blood samples received by post: the influence of delay in examination on red cell parameters. *J Small Anim Pract.* 18:95-99.



- Hirase, Y. 1992. Stable blood cell after one week storage at room temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. [en línea] 49: 504-508. Consultado 16 de Setiembre 2010. <http://www.springerlink.com/content/g80x7234308q782g/>.
- Malcom, D., E. Roderick, and J. Lumsden. 1998. *Manual of small animal clinical pathology*. British Small Animal Veterinary. London, UK.
- Médaille, C., A. Briend-Marchal, and J. P. Braun. 2006. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. *Vet. Clin. Pathol.* 35:18-23.
- Meneses, A., J. Villalobos y E. Sancho. 1993. *Manual de hematología y química clínica en medicina veterinaria*. FUNA, Heredia, C.R.
- Meyer, D., and J. Harvey. 1998. *Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis*. 2nd. ed. Saunders, Pa., U.S.
- Penny, R. H. C., C. H. Carlisle. H. A., Davidson, and E. M. Gray. 1970. Some observations on the effect of the concentration of ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) on the packed cell volume of domesticated animals. *Br.Vet. J.*126: 383-389.
- Rosato, P. N. R., F. G. V Gama, M. A. Brunet., M. O. S. Gomes, and A. E. Santana. 2009. Effects of storage time and temperature on biochemistry results from canine serum. Abstract Nr. 288. *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009*. São Paulo, Brazil.
- SAS. 2009. SAS [CD-ROM] Version 9.2. Cary, SAS Institute Inc., U.S.
- Sáenz, G., R. Jiménez, B. Valverde, L. Salazar, J. Orlich, M. Chaves, L. Salazar, M. Alvarado, y A. Barrantes. 2003. *Hematología analítica*. 4th.ed. EDNASSS, San José. CR.
- Schalm, O., N. C. Jain, and E. J. Carroll. 1975. *Veterinary hematology*. 3rd. ed. Lea & Feiberg. U.S
- Thrall, M. 2004. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins. Md. U.S.
- Weiss, D. J., and K. J. Wardrop. 2010. *Schalm's. Veterinary Hematology*. 6th. ed. Blackwell Publishing U.S.
- Willard, M., y H. Tvedten. 2004. *Diagnóstico clínico patológico práctico en los pequeños animales*. 4a ed. Intermédica, Buenos Aires, Arg.